

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08530

研究課題名（和文）二重FRETと蛍光寿命画像法を活用した開口放出関連分子の動態解析

研究課題名（英文）Analysis of molecules involved in exocytosis with dual FRET and fluorescent lifetime imaging

研究代表者

高橋 倫子（Takahashi, Noriko）

北里大学・医学部・教授

研究者番号：60332178

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：脳の働きに深くかかわる神経伝達物質の放出機構や、糖尿病の成因に深くかかわるインスリンの分泌機構について、細胞生理学的な見地から研究を行った。特に、細胞外からの放出における最終過程を制御する分子機構を明らかにするために、関連する分子を遺伝子工学的に蛍光標識し、その分子の動態や複合化を蛍光共鳴エネルギー移動や蛍光寿命測定などの先端的手法を用いて調べた。その結果、一部の細胞においては浸透圧の変化という力学的な刺激が、細胞からの放出確率を調節することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳における神経伝達物質の放出は、人としての機能に深くかかわる事象である。また、糖尿病はわが国をはじめ、アジアならびに世界において患者数が漸増傾向にある疾患であるが、その成因に深くかかわる現象としてインスリン分泌が挙げられる。我々はこれらの現象が細胞レベルでいかに起こり、環境や状況に応じて調節されているか解明した。立ち上げた実験系は、遺伝子工学的手法を用いた分子の蛍光標識、および細胞内微細環境の実時間画像化など最先端解析手法の特徴を生かしたもので、他の細胞における研究にも応用できる汎用性の高い手法である。

研究成果の概要（英文）：We investigated the mechanism of neurotransmitter release, which is involved in cognitive function, and mechanism of insulin release, which is related to the pathogenesis of diabetes mellitus. We mainly focused in the final step of secretion, exocytosis, as well as granule movement. Various molecules involved in exocytosis were labeled with fluorescent probes, and we analyzed their dynamics and assembly utilizing fluorescent resonance energy transfer and fluorescent lifetime imaging system, in two-photon excitation system. In some species of the cells, the mechanical stress, osmotic pressure, regulated the release probability.

研究分野：生理学

キーワード：神経伝達物質 分泌 糖尿病 インスリン 膜融合 レーザー顕微鏡 2光子励起

1. 研究開始当初の背景

生体现象にかかわる分子を蛍光標識し、その動態や複合化を生きた細胞内において実時間で定量し、主に分泌現象や開口放出現象との関与を調べる研究が必要と考えられた。

生細胞における分子の構造変化を調べる手法として、従来頻用されている分子内 FRET (蛍光共鳴エネルギー移動: Fluorescence Resonance Energy Transfer) は、1つの分子を2つの蛍光色素で標識し、その蛍光比から構造変化を測定する方法である。それに対し、異分子間 FRET では、両者の蛍光比を単純に取ると、FRET に無関係な分子濃度の変化も反映されてしまう。濃度変化を補正するために標識分子の濃度を別途測定すると、時差や視差が伴うので実時間イメージングには向かない。そのため、分子間 FRET の計測には蛍光寿命画像法 (FLIM: Fluorescence Lifetime Imaging) が有用である。FRET 供与体の蛍光寿命は、その濃度によらないからである。この方法で、二種類の分子の間の複合化が測れるようになった。近年 Duke 大学安田博士らの研究室で開発された赤い色素 mCyRFP-1 の活用を計画した。

mMaroon との間で FRET を起こし

mEGFP と共通の波長光で 2 光子励起が可能で

その蛍光減衰過程は single exponential で寿命測定に適し

mEGFP との蛍光分離が容易である。

したがって、mEGFP dimVenus 間の FRET と同時に mCyRFP-1 mMaroon 間の FRET が同時計測でき、「二重 FRET 計測」が可能となる。この技術を活用すると、3 種分子の複合化の実時間測定が生体組織内で可能となると考えられた。また、これらの蛍光色素を用いた動態と分子構造研究の重要性が考えられた。

図1 SNARE 複合体

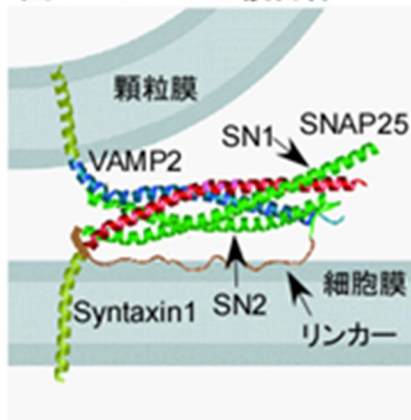


図2

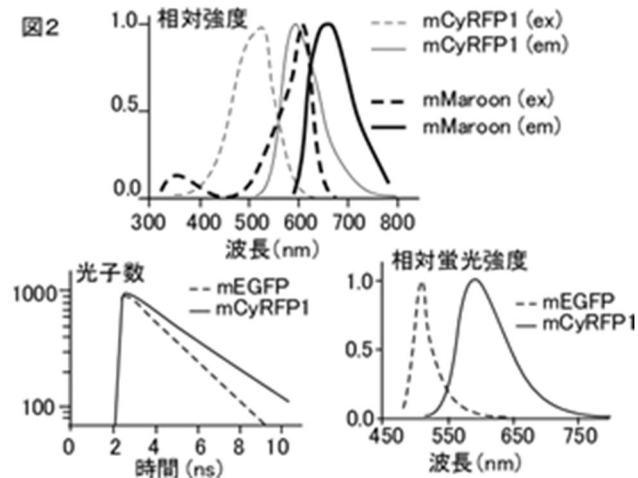


図 1: 膜融合にかかわる SNARE は 3 者が複合化することにより 2 種類の膜が融合する。神経伝達物質放出や分泌現象に深くかかわる。

図 2: FRET 実験に適する蛍光色素の組み合わせの例 mEGFP や mCyRFP は single exponential に蛍光が減衰するので、蛍光寿命測定におけるドナー色素としての活用が可能。

2. 研究の目的

開口放出および分泌現象は真核細胞や生体の機能発現に重要な現象で、その異常は 2 型糖尿病や免疫不全症をはじめとする疾患に関連する。細胞膜と顆粒膜の融合を担う中核蛋白に SNARE 分子がある。3 種の分子からなるが、それらが生体内でいかなる順序や割合で複合化し、膜融合現象と関連するか、不明な点が残っている。本計画の当初には、近年開発された色素を新規に活用して「二重 FRET 同時計測系」を立ち上げ、2 光子励起蛍光寿命画像法を併用し、分泌に関連する蛋白質の複合化の様式を直接的に解析することを目指した。複合化の見られる細胞内部位と複合化率の計測を通じて膜融合との関連を調査することを目的とした。

さらに、永年研究代表者が研究してきた膵細胞にも対象を広げ、インスリンを含有する顆粒膜の表面を蛍光標識し、細胞膜分子との複合化を FRET で検出する実験の準備を進めることも分泌研究の推進に当たり重要と考えられた。

3. 研究の方法

膵臓ベータ細胞と神経シナプス前終末において、SNARE 蛋白 3 者の複合化をリアルタイムでモニターするために、二重 FRET を起こしうる色素群; mEGFP, dimVenus および mCyRFP-1, mMaroon で SNARE 分子を遺伝子工学的に蛍光標識し、FRET プローブを作製することを目指した。dimVenus よりも更に蛍光発現の少ない ShGFP を のアクセプターとして選択した。

併せて、2 光子励起顕微鏡で実現可能で、FRET 技術を用いる実験として、細胞内の PKA 活性

を調べるために、AKAR2の色素部分を mTurquoise(ドナー)と mVenus(アクセプター)に組換えた。そして、インスリン分泌細胞で FRET 比を計測する実験系の立ち上げを行った。ウィルスベクターにも搭載し、膵島とインスリン分泌株化細胞に導入し、グルコース刺激における変化の解析を行った。

また、研究期間中に所属の異動があり、前所属における東京大学医学部構造生理学部門との共同研究も継続した。研究代表者は 2015 年に海馬初代培養神経細胞における SNARE の複合化を実時間で観察し、スクロースの吹きかけ実験において神経軸索のシナプス前終末において、蛍光寿命が短縮する(複合化が増える)事実を見出して報告していた(Nat Commun 2015 Takahashi et al.)。そして、共同研究者による脳スライス標本での実験により、これらの SNARE 複合化が伝達物質の放出確率に相関していることをシナプス後部組織(スパイン)におけるカルシウム動態を計量することで見出し報告した。今回は、浸透圧刺激をラット脳スライス標本に与え、FRET シグナル(関連分子の複合化)がシナプス前終末でいかに起き、神経伝達物質の放出にいかにか寄与するか、定量調査を行った。

さらに、インスリン分泌における開口放出前の顆粒動態を調べるために、インスリン分泌顆粒を標識して観察する実験系の立ち上げも併せて行った。

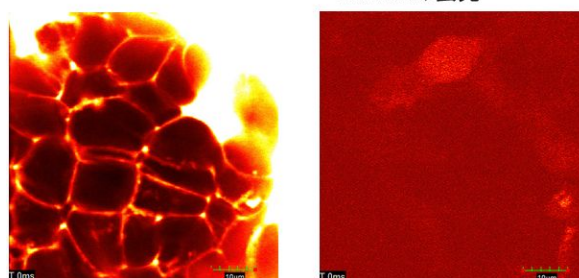
4. 研究成果

PCR 法による組換え技術を用いて pCAG-EGFP-mCyRFP1-Syntaxin1A-C1、pCAG-mCyRFP1-VAMP2-C1、pCAG-ShGFP-SNAP25-C1 3 者の発現ベクターを作製した。作成後、本色素群による FRET 法の開発者から、のドナーである mEGFP と、のドナーである mCyRFP の間で、FRET を起こしうる情報を得た。1 光子励起の場合には、これらのドナーを同時に励起し得ないので、二重 FRET が可能となるが、2 光子励起の場合には励起スペクトルが広がり、のドナーを分けて励起することができないことが判明した。したがって、当初予定した蛍光色素を用いた FRET 実験は 2 光子実験セットでは困難と考察された。

東大医学部構造生理学部門における開口放出関連分子の FRET 共同研究において、脳スライス標本における浸透圧の変化がシナプス前終末における SNARE 分子の複合化率を変え、放出確率を変化させる所見を得た。FAOPS や日本生理学会をはじめとする学会シンポジウムで発表し、現在論文準備中である。(Mechanical forces of spine enlargement detected by presynaptic FRET/FLIM imaging. Kasai H et al., Mechanosensing of the enlargement of dendritic spines by presynaptic terminals in rat hippocampus. Ucar H et al.) 以前より高浸透圧刺激(スクロース 0.3-0.5 M)はシナプス前終末の readily releasable pool(即時放出可能プール)のサイズを増やし、活動電位が到達せずとも神経伝達物質の放出を惹起する事実が知られていたが、その分子機序を明らかにする仕事と位置づけられる。さらに小さな浸透圧刺激を脳スライスに局所的に与えた場合の変化についても詳細に検討し、FRET の変化と放出確率の双方を、蛍光技術を用いて高い空間解像度で実時間観察している。このような実験を積み重ねることにより、脳内組織における浸透圧：力学的な要因が生理機能に及ぼす影響について、細胞の構造変化も併せて新知見を得ている。

PKA 活性を反映する FRET プローブである AKAR2 において、蛍光色素を蛍光寿命測定に適する mTq-Venus に組み替えて遺伝子発現プローブを作製した。無事に AKAR2 の蛍光は細胞に発現し、水溶性蛍光色素との同時 3 重染色は可能となったが、発現させた細胞におけるグルコース依存的な開口放出像が検出されず、分泌現象と AKAR2 の相関解析はできず、単独での AKAR2 のシグナルを経時観察する実験を実施した。(図 3 膵島に PKA 活性を反映する FRET プローブを遺伝子発現させ、開口放出を検出する水溶性蛍光色素 Alexa594 との同時多重染色画像を取得)

図3 膵島を同時多重染色
インスリン開口放出を検出するAlexa594蛍光
PKA活性を検出するFRETプローブAKAR2の蛍光



さらに高解像での観察が可能となる STED の併用も試み、東京大学 IRCN の施設に導入された蛍光寿命測定顕微鏡の活用を図った。2 種類の SNARE を EGFP と TMR (tetramethylrhodamine) で標識し、海馬培養神経細胞に発現させることにより、FRET の検出に成功した。しかし、TMR には STED 効果が乏しく、ドナーとアクセプターの解像度の違いから単純な蛍光比取得には問題が残ると結論された。一方で、別の赤外領域の蛍光色素(市販)で顆粒膜 SNARE (VAMP2) や細胞膜 SNARE (SLIM) を標識したところ、775nm の STED 光にて超解像構造が確認され、蛍光減衰も単調に(single exponential に)起きることから、FRET のドナー色素として活用できる可能性が提示された。

並行して、インスリン顆粒膜を蛍光標識し、FRET 実験に供する実験系の立ち上げに着手した。Tag 蛋白とそのリガンドに結合した量子ドットを用いて、新たな蛍光標識法の立ち上げにも着手した。インスリン分泌細胞において、平均直径 380 nm 前後の点状蛍光像が確認され、抗体染色から測定されたインスリン顆粒の大きさに合致しており、動態解析に適するものと考えられる。拡散係数や能動性を定量化する実験解析系の構築に成功し、一部の薬剤において効果を認めている。インスリン分泌顆粒は細胞内部での融合反応が少なく、細胞膜への輸送過程において分泌調節を受けやすい特徴を持つと考えられ、動態と膜融合反応への双方の解明に活用する計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tse A, Lee AK, Takahashi N, Gong A, Kasai H, Tse FW.	4. 巻 32
2. 論文標題 Strong stimulation triggers full fusion exocytosis and very slow endocytosis of the small dense core granules in carotid glomus cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurogenet	6. 最初と最後の頁 267-278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/01677063.2018.1497629	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ishii K, Nagaoka A, Kishida Y, Okazaki H, Yagishita S, Ucar H, Takahashi N, Saito N, Kasai H.	4. 巻 5
2. 論文標題 In Vivo Volume Dynamics of Dendritic Spines in the Neocortex of Wild-Type and Fmr1 KO Mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/ENEURO.0282-18.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 高橋 倫子	4. 巻 69
2. 論文標題 エクソサイトーシスの分子機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 227-232
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Noguchi J, Nagaoka A, Hayama T, Ucar H, Yagishita S, Takahashi N, Kasai H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Bidirectional in vivo structural dendritic spine plasticity revealed by two-photon glutamate uncaging in the mouse neocortex.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 13922
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-50445-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 高橋 倫子	4. 巻 50
2. 論文標題 インスリン分泌のダイナミクス	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 糖尿病・内分泌代謝科	6. 最初と最後の頁 71-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 高橋 倫子 守本 祐一 河西 春郎
2. 発表標題 蛍光技術を活用した生理活性物質放出機構の解析
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Noriko Takahashi
2. 発表標題 Molecular configuration for primed exocytosis analyzed with 2-photon FLIM.
3. 学会等名 Forefront of Neurotransmitter Release and Calcium Channel Signaling-A Symposium in honor of Sumiko Mochida (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukiko Yasuoka, Tomomi Oshima, Yuichiro Izumi, Yuichi Sato, Noriko Takahashi, Hiroshi Nonoguchi, Katsumasa Kawahara.
2. 発表標題 Fludrocortisone stimulates erythropoietin (Epo) protein expression in the distal tubules of mouse kidney.
3. 学会等名 American Society of Nephrology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukiko Yasuoka, Tomomi Oshima, Yuichiro Izumi, Yuichi Sato, Noriko Takahashi, Hiroshi Nonoguchi, Katsumasa Kawahara.
2. 発表標題 Production and release of the erythropoietin (Epo) protein by the severe hypoxia.
3. 学会等名 American Society of Nephrology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hasan Ucar, Satoshi Watanabe, Jun Noguchi, ShoYagishita, Yuichiro Morimoto, Noriko Takahashi, Haruo Kasai.
2. 発表標題 Potentiation of presynaptic functions by mechanical forces generated by spine enlargement.
3. 学会等名 Annual Meeting of Society of Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Noriko Takahashi, Hiroyasu Hatakeyama, Tomomi Oshima, Yuichi Morimoto, Haruo Kasai.
2. 発表標題 Imaging secretory cells and molecular configurations of exocytic proteins.
3. 学会等名 FAOPS 2019 (The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruo Kasai, Hasan Ucar, Jun Noguchi, Satoshi Watanabe, Sho Yagishita, Noriko Takahashi.
2. 発表標題 Mechanical forces of spine enlargement detected by presynaptic FRET/FLIM imaging.
3. 学会等名 FAOPS 2019 (The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukiko Yasuoka, Tomomi Oshima, Yuichi Sato, Hiroshi Nonoguchi, Noriko Takahashi, Katsumasa Kawahara.
2. 発表標題 Low-Pi diet-induced metabolic acidosis with alkalinuria was reversed in the Pendrin KO mice.
3. 学会等名 FAOPS 2019 (The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidekazu Fukuda, Noriko Takahashi.
2. 発表標題 Characterizations of the HCO ₃ ⁻ transport activities of a choroid plexus-specific variant of NBC4.
3. 学会等名 FAOPS 2019 (The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 倫子
2. 発表標題 基礎医学から広がる糖尿病学
3. 学会等名 第60回糖尿病学会年次学術集会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高橋 倫子
2. 発表標題 画像化手法を用いた膵内分泌研究
3. 学会等名 第44回日本神経内分泌学会学術集会 シンポジウム「神経内分泌研究に役立つ生理研究手法」(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuichi Morimoto, Wakako Sawada, Haruo Kasai, Noriko Takahashi
2. 発表標題 Configuration of SNARE proteins and calcium-dependent exocytosis
3. 学会等名 20th International Symposium on calcium binding proteins and calcium function in health and disease (CaBP2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 守本 祐一, 澤田 和可子, 河西 春郎, 高橋 倫子
2. 発表標題 蛍光技術と2光子顕微鏡を活用した開口放出機構の解析
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大嶋 友美, 安岡 有紀子, 福田 英一, 高橋 倫子, 河原 克雅
2. 発表標題 腎皮質集合管のB型間在細胞(側底膜)に局在するCa感知受容体の役割
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋 倫子
2. 発表標題 基礎医学から糖尿病学へのアプローチ
3. 学会等名 日本糖尿病学会関東甲信越支部 Young Diabetologists Research Forum (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ucar Hasan、渡辺 恵、野口 潤、柳下 祥、守本 祐一、高橋 倫子、河西 春郎
2. 発表標題 Leading -edge approach for regulated exocytosis in neural system. Mechanosensing of the enlargement of dendritic spines by presynaptic terminals in rat hippocampus.
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukiko Yasuoka, Tomomi Oshima, Yuichi Sato, Noriko Takahashi, Hiroshi Nonoguchi, Katsumasa Kawahara
2. 発表標題 Renal tissue kallikrein may be involved in the regulatory Ca transport along the kidney distal nephron
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学医学部生理学（高橋単位） https://www.kitasato-u.ac.jp/med/research/departments/medicine/seiri-kh.html 蛍光技術を活用した生理活性物質の放出機構の解明 高橋倫子 科研費News 2017年度 http://www.jsps.go.jp/j-grantsinaid/22_letter/data/news_2017_vol13/p17.pdf 生理学（高橋単位） 北里大学医学部 https://www.kitasato-u.ac.jp/med/research/departments/medicine/seiri-kh.html

6. 研究組織		
氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考